ARTÍCULO ORIGINAL

Evaluación de métodos y establecimiento de valores de referencia hematológicos para la población del Gran Mendoza

Kordys, M.E.[1*]; Gallego, F.[2]; Collino, C.J.[2]
[1] Servicio de Hematología Clínica, Hospital El Carmen, Godoy Cruz, Mendoza, Argentina.
[2] Servicio de Laboratorio, Hospital Rawson, Ministerio de Salud de la Provincia de Córdoba, Córdoba, Argentina.

Contacto: María Eugenia Kordys. E-mail: eugenia_mek@hotmail.com

RESUMEN La evaluación de métodos es un conjunto de procesos necesarios que el laboratorio bioquímico debe realizar de manera previa a la implementación metodológica de sistemas de medición. Esta forma de trabajo permite evaluar el desempeño del método a partir de la discusión de diferentes parámetros estadísticos, los cuales se obtienen al aplicar protocolos estipulados de validación, verificación y demostración de métodos. En este sentido, y priorizando siempre la confiabilidad analítica y clínica del resultado, esta primera etapa se complementa con una estrategia de control de calidad interno que nos permitirá evidenciar la estabilidad analítica del método evaluado; además, la participación en programas de evaluación externa de la calidad nos brindará información del método principalmente en términos de veracidad. Los objetivos del presente estudio fueron aplicar protocolos establecidos de evaluación de métodos para evaluar el desempeño del sistema de medición, y establecer valores de referencia - intervalos de referencia de los parámetros hematológicos: hemoglobina, hematócrito, volumen corpuscular medio, hemoglobina corpuscular media, concentración de hemoglobina corpuscular media, Índice de amplitud de distribución eritrocitaria, recuento de glóbulos blancos, recuento de glóbulos rojos y recuento de plaquetas, en individuos adultos sanos de la población de Mendoza (edad: 18-65 años). Se analizaron un total de 241 muestras, y las determinaciones fueron realizadas en dos autoanalizadores hematológicos: *Cell Dyn 3700 SL y Cell Dyn 3500* (Abbott, nº de serie 20557AK y nº de serie 31095P, respectivamente). Se aplicó el criterio de partición, y se halló que los siguientes analitos particionaron por sexo: glóbulos rojos, hematócrito, hemoglobina, concentración de hemoglobina corpuscular media; mientras que los analitos que no particionaron por sexo, fueron: glóbulos blancos, volumen corpuscular medio, hemoglobina corpuscular media, índice de amplitud de distribución eritrocitaria y plaquetas. A través de la aplicación de protocolos de evaluación de métodos, se obtuvieron resultados satisfactorios respecto al desempeño del método. Se establecieron los valores de referencia - intervalos de referencia tanto para los analitos que particionaron, como para los que no particionaron en cuanto al sexo de los individuos. Realizamos previamente la evaluación del método de medición aplicado, por lo tanto los valores de referencia - intervalos de referencia obtenidos brindarían un marco de confiabilidad mayor sobre los resultados obtenidos.
PALABRAS CLAVE: validación, verificación, valores de referencia, control de calidad interno, parámetros hematológicos

ABSTRACT The evaluation of methods is a set of necessary processes that the biochemical laboratory should be performed prior to the methodology implementation of measuring systems. This kind of work allows to evaluate the performance of the method from the discussion of different statistical parameters, which are obtained by applying stipulated protocols of validation, verification and demonstration of methods. In this sense, and always giving priority to the analytical and clinical confidence in the outcome, this first stage is complemented by a strategy of Internal Quality Control that will allow us to demonstrate the analytical stability of the evaluated method. In addition, participation in External Evaluation of Quality Programs provides us method information mainly in terms of trueness. The aims of the present study were to apply established protocols of methods evaluation to evaluate the performance of the measuring system, and establishment of references values – reference intervals of hematological parameters: Hemoglobin, Hematocrit, Mean Corpuscular Volume, Mean Corpuscular

Hemoglobin, Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration, Red Distribution Wide, White Blood Cells, Red Blood Cells and Platelet Count, in clinically healthy adults of the town of Mendoza (age: 18-65 years). A total of 241samples were analyzed, and determinations were carried out on two hematological analyzers: Cell Dyn 3700 SL and Cell Dyn 3500 (Abbott, no. 20557AK and no. 31095P, respectively). We applied the partition criterion, and we found that the following analytes partitionated by sex: Red Blood Cells, Hemoglobin, Hematocrit, Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration; while the following analytes are not partitionated by sex, were: White Blood Cells, Red Distribution Wide, Mean Corpuscular Volume, Mean Corpuscular Hemoglobin and Platelet Count. Through the application of evaluation methods protocols, were obtained satisfactory results with respect to the performance of the method. We established the references values – reference intervals of the analytes which partitionated, and those analytes which are not partitionated by sex. Previously, we applied measuring method evaluation; in addition we obtained references values – reference intervals which would provide a framework of confidence on the results obtained.

KEY WORDS: validation, verification, values of reference, internal quality control, hematological parameters.

ISSN 1515-6761 Ed. Impresa
ISSN 2250-5903 Ed. CD-ROM
Código Bibliográfico: RByPC
Fecha de Recepción: 18/12/2013.
Fecha de Aceptación: 18/02/2014.

INTRODUCCIÓN

La medición de un analito hematológico de interés clínico en un fluido biológico humano complejo, como la sangre periférica, involucra tres etapas fundamentales: a) preanalítica, b) analítica, y c) posanalítica. Dentro de cada una de estas etapas podemos identificar y sectorizar tanto requisitos técnicos inherentes al desempeño analítico metodológico, como también requisitos de gestión propios del laboratorio que pugnan por el aseguramiento de la calidad del servicio que se brinda[1,2,3].

La etapa analítica involucra el proceso de medición del analito a través de la ejecución de un método, el cual debe necesariamente haber sido "evaluado" antes del comienzo de su aplicación en la rutina del laboratorio. Además, este método debe seguir un procedimiento operativo de realización estipulado y una estrategia de control de calidad interna establecida, la cual se desprende del mencionado proceso de evaluación del método[4,5,6,7].

La seguridad y la confiabilidad analítica de un método están sujetas a aspectos que están relacionados entre sí, a saber: 1) requerimientos de calidad, entendiendo que son estándares de calidad para parámetros analíticos, principalmente definidos en términos de precisión y exactitud, y que el principal requerimiento de calidad que poseemos en la química clínica el "error total permitido", cuya magnitud es dependiente del nivel de decisión médica (decisión diagnóstica, pronóstica y terapéutica); 2) La evaluación de métodos, obtenida a través de la aplicación de protocolos de validación y/o verificación de métodos, los cuales son ensayos que permiten obtener la magnitud de los parámetros analíticos de un método, y a través de ellos evaluar el desempeño (*performance*) del método en estudio. En este sentido la verificación de métodos es realizada por el laboratorio bioquímico con el propósito de demostrar que el reactivo o equipo adquirido reproduce los parámetros analíticos informados por el fabricante; no obstante, las estrategias experimentales que aplica el fabricante de un equipamiento para validarlo como aquella que aplica el laboratorio bioquímico para realizar la verificación son en esencia las mismas; 3) control de calidad interno y externo, la estrategia del diseño de estos sistemas de control permiten demostrar que la calidad analítica obtenida a partir de la aplicación de protocolos de evaluación de métodos mantiene en el tiempo valores de imprecisión e inexactitud aceptables, es decir que el método se ejecuta de manera estable. La finalidad de la aplicación de estos esquemas de trabajo es básicamente obtener resultados confiables, tanto en lo analítico como en lo clínico, y reproducibles[7,8,9].

El establecimiento de valores de referencia - intervalos de referencia es un componente indispensable de la confiabilidad de un sistema de medición, principalmente para poder interpretar la significancia del resultado obtenido sobre el analito valorado. Este marco analítico referencial debe ser desarrollado para todos los analitos valorados en un laboratorio bioquímico, ya que por un lado el desplazamiento poblacional (globalización), así como diferencias en edad y sexo de los individuos, terminan por conformar sociedades con distintas etnias sobre las cuales se aplican los sistemas de medición utilizados en el laboratorio bioquímico. En este sentido, es necesario contextualizar el valor obtenido del analito cuantificado en un marco de referencia correctamente establecido para la población estudiada[10].

Por lo tanto, los objetivos de este trabajo fueron aplicar protocolos de evaluación de métodos para establecer y evidenciar el correcto desempeño de los sistemas de medición empleados, y finalmente establecer valores de referencia - intervalos de referencia para analitos hematológicos en la población del Gran Mendoza.

MATERIALES Y MÉTODOS

Equipamiento utilizado. Para realizar la totalidad de las determinaciones se utilizaron dos autoanalizadores hematológicos, un *Cell Dyn 3700 SL* (Abbott, nº de serie 20557AK) que combina las tecnologías de dispersión de luz óptica y de impedancia, proveyendo información de 24 parámetros hematológicos; y otro equipo de similares ca-

racterísticas *Cell Dyn 3500* (Abbott, nº de serie 31095P). Se utilizaron fracciones de ensayos de muestras de pacientes que tuvieron solicitud de la determinación de Hemograma en nuestro laboratorio.

Ensayos de evaluación de métodos. Para realizar la evaluación de desempeño de la metodología aplicada se utilizaron muestras de sangre entera de pacientes voluntarios sanos obtenidas por venopunción, y recolectadas en tubos marca *Tecnon* con EDTA 3K como anticoagulante. Se siguieron los lineamientos de las siguientes guías de validación/verificación del CLSI *(Clinical Laboratory Standar Institute)*: EP15-A2 para la evaluación de la precisión, EP9-A2 para evaluación de la veracidad, EP6-A para evaluación de la linealidad[4,5,6,7]. Estos protocolos de trabajo fueron aplicados sobre todos los analitos que se valoran en el hemograma. Para establecer los Valores de Referencia - Intervalos de Referencia de los diferentes analitos, se utilizó la guía C28-A3 del CLSI [10].

Establecimiento de valores de referencia - intervalos de referencia. En este caso la selección de la población de estudio se realizó siguiendo la guía C28-A3 del CLSI [10]. Para ello se recolectaron 241 muestras de individuos sanos (121 hombres y 120 mujeres), entre 18 y 65 años, que asistieron a determinados laboratorios del Gran Mendoza; esto incluye los departamentos de Capital, Guaymallén, Godoy Cruz, Las Heras, Luján de Cuyo y Maipú. Allí se les realizó una encuesta informativa sobre este trabajo, se los invitó a participar de él, y se les hizo firmar un consentimiento. El criterio de división fue el sexo y los criterios de exclusión fueron: enfermedades crónicas o infecciosas, consumo de medicamentos en forma regular, haber donado sangre o haber recibido transfusión de sangre en los últimos 4 meses, hospitalización reciente, antecedentes personales o familiares de anemia, embarazo, lactancia y si eran fumadores o no. Las muestras fueron enviadas posteriormente al laboratorio Meganalizar, de la firma Analizar SA, donde se procesaron dentro de las 4 horas subsiguientes a su recolección. Los parámetros analizados fueron: hemoglobina (Hb), hematócrito (Hto), volumen corpuscular medio (VCM), hemoglobina corpuscular media (HCM), concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM), índice de amplitud de distribución eritrocitaria (RDW), recuento de glóbulos blancos (GB), recuento de glóbulos rojos (GR) y recuento de plaquetas (Plaq.)

Análisis estadísticos empleados. Para el procesamiento estadístico de los datos se utilizaron planillas de cálculo de *Excell* (*Microsoft Office Excell* Versión 2007), las cuales contienen formulas matemáticas necesarias para desarrollar el diseño estadístico aplicado. Se utilizó también el programa *Infostat* (Versión 2011p) para el estudio de validación de la linealidad del sistema de medición, y además se empleó el programa *MedCalc* (Versión 12.7.0.0) para aplicar los tests estadísticos *D'agostino-Pearson* como test de evaluación de la normalidad, *Mann-Whitney* como test no paramétrico, y los métodos de *Tukey* y *Reed/Dixon* para la búsqueda de valores anómalos[11,12,14].

Control de calidad interno. El diseño del control de calidad interno (CCI) emplea las recomendaciones del fabricante de los equipos mencionados, que consisten en el análisis diario de muestras controles estabilizadas en tres niveles de concentración para cada uno de los analitos evaluados. Además, también obtuvimos y diseñamos un esquema propio que incluye el desempeño del método, y que contempla el mencionado desempeño a partir del establecimiento del punto operativo y de la valoración del error sistemático crítico del método[8,13].

Control de calidad externo. El laboratorio participa en un programa de evaluación externa de la calidad (CCE), donde realiza la valoración de los distintos analitos en una muestra de sangre periférica estabilizada; y esto se efectúa con una periodicidad mensual. La participación en un CCE permite que el laboratorio obtenga índices de rendimiento en términos de veracidad, principalmente. Es de una relevancia mayor en la elección del proveedor del CCE el hecho de que cumplimente los lineamientos de la norma ISO 17043 [15]; en este sentido la participación del laboratorio en un CCE contribuye a la demostración de su competencia técnica[16].

RESULTADOS

Evaluación de métodos - precisión

Se realizó una verificación de la precisión siguiendo los lineamientos de la guía EP15-A2 del CLSI. Los analitos evaluados fueron: GB, GR, Hb, Hto, VCM y Plaq; sin embargo, se valoraron la totalidad de los parámetros obtenidos por los equipos de medición.

Se realizaron mediciones por triplicado durante cinco corridas analíticas de una misma muestra. Dicha muestra se obtuvo a partir de un individuo adulto clínicamente sano. Las determinaciones fueron realizadas en los equipos *Cell Dyn 3700 (CD3700)* y *Cell Dyn 3500 (CD3500),* tanto en *modo abierto(A)* como en *modo cerrado(C)* de trabajo de los equipos, durante un período de tiempo inferior a 4 h desde el momento de la toma de muestra para garantizar su integridad.

Para analizar los resultados se compararon los datos obtenidos con las especificaciones del fabricante (Tabla I), y con las de las especificaciones internacionales de calidad brindadas por CLIA´88 (*Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988,* Tabla II) utilizando un presupuesto de error del 25%; y además se realizó la comparación con las especificaciones internacionales de calidad de EQAs (*European Quality Assurance)*, para condiciones mínimas, deseables y optimas de desempeño. La comparación de los resultados obtenidos con las especificaciones del fabricante y la comparación con las especificaciones internacionales de calidad, se muestran en las tablas I y II, respectivamente.

Tabla I. Comparación con especificaciones de precisión (Repetibilidad) del fabricante

Equipo	Analito	Media	CV% calc.	CV% Fabr.	Sr Calc.	Sr Verif.
CD3500A	GB (10^3 cel./µL)	5	2	1,9	**0,1**	**0,14**
CD3500C	GB (10^3 cel./µL)	5,17	2,1	1,9	**0,11**	**0,14**
CD3700A	GB (10^3 cel./µL)	4,88	1,4	1,9	**0,07**	**0,13**
CD3700C	GB (10^3 cel./µL)	4,79	2,3	1,9	**0,11**	**0,13**
CD3500A	GR (10^6 cel./µL)	4,74	0,8	1	**0,04**	**0,07**
CD3500C	GR (10^6 cel./µL)	4,76	0,4	1	**0,02**	**0,07**
CD3700A	GR (10^6 cel./µL)	4,73	0,6	1	**0,03**	**0,07**
CD3700C	GR (10^6 cel./µL)	4,74	1,1	1	**0,05**	**0,07**
CD3500A	Hb (g/dL)	13,61	0,5	0,7	**0,07**	**0,14**
CD3500C	Hb (g/dL)	13,61	0,7	0,7	**0,1**	**0,14**
CD3700A	Hb (g/dL)	13,47	0,9	0,7	**0,12**	**0,13**
CD3700C	Hb (g/dL)	13,77	0,9	0,7	**0,13**	**0,14**
CD3500A	VCM (fL)	87,54	0,5	0,8	**0,48**	**1**
CD3500C	VCM (fL)	87,31	0,4	0,8	**0,38**	**1**
CD3700A	VCM (fL)	89,2	0,4	0,8	**0,32**	**1,02**
CD3700C	VCM (fL)	88,26	0,6	0,8	**0,53**	**1,01**
CD3500A	Plaq (10^3 cel./µL)	167,73	2,7	3,1	**4,49**	**7,44**
CD3500C	Plaq (10^3 cel./µL)	171,07	2,2	3,1	**3,8**	**7,59**
CD3700A	Plaq (10^3 cel./µL)	167,6	3,2	3,1	**5,3**	**7,44**
CD3700C	Plaq (10^3 cel./µL)	174,8	2,7	3,1	**4,65**	**7,75**

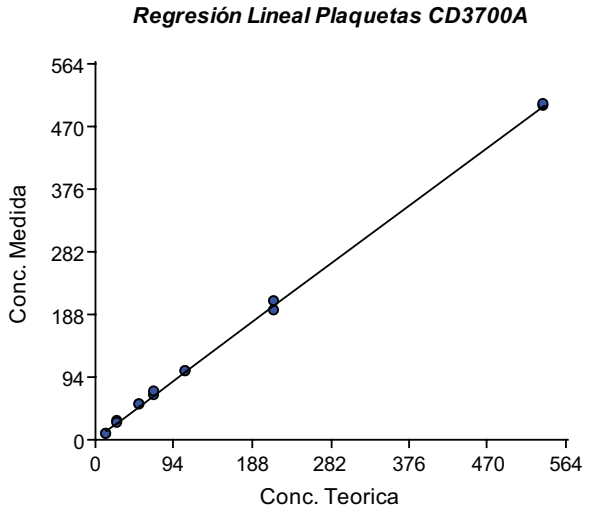
CD3500A: Equipo CellDyn 3500 en modo abierto; CD3500C: Equipo CellDyn 3500 en modo cerrado; CD3700A: Equipo CellDyn 3700 en modo abierto; CD3700C: Equipo CellDyn 3700 en modo cerrado; GB: Recuento de glóbulos blancos; GR: Recuento de glóbulos rojos; Hb: Hemoglobina; VCM: Volumen Corpuscular Medio; Plaq: Recuento de Plaquetas; CV% calc.: Coeficiente de variación porcentual obtenido a partir de la precisión en términos de repetibilidad en la verificación de Métodos; CV% Fabr.: Coeficiente de variación porcentual informado por el fabricante a partir de la precisión en términos de repetibilidad; Sr calc.: Precisión en términos de repetibilidad obtenidos en la verificación de métodos ; Sr Verif.: Valor de verificación para la precisión en términos de repetibilidad.

Los resultados obtenidos para todos los analitos evaluados cumplieron con los requisitos de calidad especificados por el fabricante en términos de repetibilidad. En este sentido, la totalidad de los analitos valorados cumplieron con los requerimientos de calidad especificados por CLIA´88 aplicando un presupuesto de error del 25%; además cumplimentaron con los niveles de condiciones mínimas y deseables de EQAs, verificando de esta manera el desempeño del método en términos de precisión intermedia. Cabe destacar que los analitos Hb y VCM cumplieron con los niveles de condiciones óptimas de especificaciones de EQAs.

Evaluación de métodos – linealidad

Se demostró el comportamiento lineal de los distintos analitos valorados por los dos equipos automatizados utilizados, tanto en el modo abierto de trabajo, como en el modo cerrado, siguiendo los lineamientos de la guía EP6-A del CLSI [5]. La evaluación polinomial se realizó con el programa *Infostat V. 2011* [14]. Para cada uno de los analitos evaluados se valoraron ocho niveles de concentración. Para realizar este ensayo se siguieron los lineamientos de la guía H26-A2 del CLSI[3]; brevemente: se partió de una muestra de sangre periférica con niveles elevados para los analitos estudiados, se la colocó en posición vertical, y se la dejó en reposo en esa posición durante 2 horas de manera que sedimenten los elementos formes celulares. Luego, utilizando plasma de esa misma muestra se realizaron las correspondientes diluciones utilizando una micropipeta automática de volumen variable de 10–100µl (*Labklass*), para obtener los 8 puntos de concentración evaluados. En ese estudio, los rangos reportables de concentración estudiados para todos los analitos, abarcaron los rangos de concentración informados por el fabricante. En este punto, y para evaluar este aspecto en el analito "VCM", se partió de 2 muestras con distinto

Figura 1. Regresión lineal



CD3700A: Equipo CellDyn 3700 modo abierto.
En la figura se muestra la regresión lineal: En el eje Y se graficaron las concentraciones medidas, y en el X las teóricas (calculadas). Ambas concentraciones se expresan en 10^3 cel./µL. Rango de linealidad evaluado: 13,44 - 537,5 Plaq.x10^3/ µL.

valor de VCM (una cercana al límite superior del rango reportable, y otra al inferior), y se realizaron mezclas de ambas muestras en diferentes proporciones obtenidas a través de los cálculos teóricos realizados para obtener cada uno de los valores de VCM deseados.

En la tabla III y la figura 1 se muestran los resultados obtenidos a modo de ejemplo para el analito plaquetas en el equipo *CellDyn 3700* modo abierto.

En los casos donde el comportamiento del sistema de medición fue no lineal y fue explicado mejor por un polinomio de segundo o tercer orden, se calculó el factor de "desviación de la linealidad (DL)"; para ello se estableció como requerimiento de calidad que la DL no supere el 5% entre todos los valores obtenidos por el polinomio que mejor ajusta el comportamiento del sistema de medición y los obtenidos por el polinomio de primer orden (lineal). Para la totalidad de los niveles de concentración evaluados en todos los analitos valorados, se obtuvo un comportamiento aceptable acorde con el requerimiento establecido (datos no mostrados).

Evaluación de métodos – veracidad

Ambos equipos se encuentran participando en un programa

Tabla II. Comparación con especificaciones de precisión (Intermedia) de entidades internacionales

Equipo	Analito	Media	CV% calc.	CLIA (CV%)	Min. (CV%)	EQA - Des. (CV%)	EQA - Opt. (CV%)
CD3500A	GB (10^3 cel./µL)	5	2,2	3,75	8,4	5,6	2,8
CD3500C	GB (10^3 cel./µL)	5,17	2,9	3,75	8,4	5,6	2,8
CD3700A	GB (10^3 cel./µL)	4,88	2,46	3,75	8,4	5,6	2,8
CD3700C	GB (10^3 cel./µL)	4,79	3,97	3,75	8,4	5,6	2,8
CD3500A	GR (10^6 cel./µL)	4,74	0,84	1,5	2,6	1,7	0,9
CD3500C	GR (10^6 cel./µL)	4,76	0,63	1,5	2,6	1,7	0,9
CD3700A	GR (10^6 cel./µL)	4,73	0,85	1,5	2,6	1,7	0,9
CD3700C	GR (10^6 cel./µL)	4,74	1,05	1,5	2,6	1,7	0,9
CD3500A	Hb (g/dL)	13,61	0,66	1,75	2,7	1,8	0,9
CD3500C	Hb (g/dL)	13,61	0,81	1,75	2,7	1,8	0,9
CD3700A	Hb (g/dL)	13,47	0,82	1,75	2,7	1,8	0,9
CD3700C	Hb (g/dL)	13,77	0,87	1,75	2,7	1,8	0,9
CD3500A	VCM (fL)	87,54	0,57	S/D	1,9	1,2	0,6
CD3500C	VCM (fL)	87,31	0,45	S/D	1,9	1,2	0,6
CD3700A	VCM (fL)	89,2	0,44	S/D	1,9	1,2	0,6
CD3700C	VCM (fL)	88,26	0,51	S/D	1,9	1,2	0,6
CD3500A	Plaq (10^3 cel./µL)	167,73	4,87	6,25	8,9	5,9	3
CD3500C	Plaq (10^3 cel./µL)	171,07	3,15	6,25	8,9	5,9	3
CD3700A	Plaq (10^3 cel./µL)	167,6	3,83	6,25	8,9	5,9	3
CD3700C	Plaq (10^3 cel./µL)	174,8	2,77	6,25	8,9	5,9	3

CD3500A: Equipo CellDyn 3500 en modo abierto; CD3500C: Equipo CellDyn 3500 en modo cerrado; CD3700A: Equipo CellDyn 3700 en modo abierto; CD3700C: Equipo CellDyn 3700 en modo cerrado; GB: Recuento de glóbulos blancos; GR: Recuento de glóbulos rojos; Hb: Hemoglobina; VCM: Volumen Corpuscular Medio; Plaq: Recuento de Plaquetas; CV% calc.: Coeficiente de variación porcentual obtenido a partir de la precisión intermedia en la verificación de Métodos; CLIA y EQA: Requerimientos internacionales de calidad.

CCE desde 2012 y, hasta la fecha, se procesaron 18 muestras control por el equipo *CellDyn 3700*, y 16 por el *CellDyn 3500*. Los resultados obtenidos fueron aceptados para todos los analitos estudiados, y los errores (en términos de BIAS %) promedio para cada analito y equipo se muestran en la tabla IV.

Comparación entre equipos/modos de trabajo

Para realizar las comparaciones de métodos se siguieron los lineamientos de la guía EP9-A2 del CLSI[6]. Las mismas muestras fueron procesadas por ambos equipos por duplicado, tanto en modo abierto como en modo cerrado. Se evaluó la presencia de valores aberrantes de concentración de los diferentes analitos, *Outliers* (OL), dentro de cada método y entre los métodos, acorde con las especificaciones de la guía mencionada. Para cada analito evaluado se aplicó regresión de Deming (MedCalc V. 12.7.0.0), y se realizaron las comparaciones mencionadas a continuación:

- CellDyn 3500 modo abierto vs CellDyn 3500 modo cerrado.
- CellDyn 3700 modo abierto *vs* CellDyn 3700 modo cerrado.
- CellDyn 3500 modo abierto *vs* CellDyn 3700 modo abierto.
- CellDyn 3500 modo cerrado *vs* CellDyn 3700 modo cerrado.

En la tabla V se muestra, modo de ejemplo, los resultados obtenidos de una de las comparaciones realizadas: CellDyn 3500 modo cerrado *vs* CellDyn 3700 a modo cerrado, para todos los analitos evaluados.

En la figura 2 se muestra, a modo de ejemplo, los resultados obtenidos en representaciones gráficas de una de las comparaciones realizadas: CellDyn 3500 modo cerrado *vs* CellDyn 3700 modo cerrado, para todos los analitos evaluados. En todos los niveles de decisión médica (NDM) analizados para los siguientes analitos: GB, GR, Hb y Plaq.; el BIAS% obtenido no superó el requerimiento de calidad estipulado por CLIA'88 con base en un presupuesto de error del 25%.

Tabla III: Resultados de la regresión (CD3700A), analito: PLAQUETAS.

Orden	Coef.	Valor coef.	E.E. Coef	t	p-Valor	G.L.	Des. Est. Residual	Valores O.L.
Primer	b0	0,88192	1,27094	0,69392	0,5009	12	3,61	1050; 1100
Primer	b1	0,93077	0,00564	165,0675	<0,0001	12	3,61	1050; 1100
Segundo	b0	0,24427	1,93204	0,12643	0,9017	11	3,74	1050; 1100
Segundo	b1	0,94221	0,02604	36,18083	<0,0001	11	3,74	1050; 1100
Segundo	b2	-0,00002	0,00005	-0,4506	0,661	11	3,74	1050; 1100
Tercero	b0	-0,51178	5,92181	-0,08642	0,9326	12	10,77	Ninguno
Tercero	b1	0,96615	0,09215	10,48485	<0,0001	12	10,77	Ninguno
Tercero	b2	-0,00016	0,00025	-0,64224	0,5328	12	10,77	Ninguno
Tercero	b3	1,80E-07	1,60E-07	1,13294	0,2794	12	10,77	Ninguno

Coef.: Coeficiente del polinomio; E.E.: Error Estándar; t: Valor obtenido del test-t; p-valor: valor p asociado al resultado del test-t; G.L.: Grados de Libertad; Des. Est. Residual: Desviación Estándar Residual de la regresión; Valores O.L.: Valores anómalos.

Tabla IV: Estimación del BIAS% a partir del CCE

Equipo	GB (BIAS%)	GR (BIAS%)	Hb (BIAS%)	VCM (BIAS%)	Plaq (BIAS%)
CD3500	1,63	0,42	0,12	2,88	4,08
CD3700	2,01	0,88	1,37	3,54	5,13

CD3500: Equipo CellDyn 3500; CD3700: Equipo CellDyn 3700; GB: Recuento de Glóbulos Blancos; GR: Recuento de Glóbulos Rojos; Hb: Hemoglobina; VCM: Volumen Corpuscular Medio; Plaq: Recuento de Plaquetas.

Tabla V: Comparación de equipos. Resultados obtenidos para la regresión de Deming.

Analito - Comparación	O. Origen (IC 95%)	Pendiente (IC 95%)	$S_{y \bullet x}$	r
GB - 3500C vs 3700C	0,033 (-0,269 a 0,335)	1,013 (0,964 a 1,061)	0,458	0,9864
GR - 3500C vs 3700C	-0,100 (-0,269 a 0,068)	1,016 (0,975 a 1,057)	1,192	0,995
Hb - 3500C vs 3700C	-0,042 (-0,627 a 0,543)	0,995 (0,949 a 1,040)	0,487	0,9943
Hto - 3500C vs 3700C	-1,824 (-3,663 a 0,015)	1,028 (0,980 a 1,075)	1,268	0,995
VCM - 3500C vs 3700C	-3,288 (-6,254 a -0,321)	1,023 (0,991 a 1,055)	0,603	0,997
Plaq - 3500C vs 3700C	5,470 (-7,985 a 18,925)	0,898 (0,848 a 0,949)	0,662	0,979

GB: Recuento de Globulos Blancos; Hb: Hemoglobina; O.L.: Valores anómalos; r: coeficiente de correlación; O. Origen: Ordenada al origen; $S_{y \bullet x}$: Desviación estándar de la regresión.

Figura 2. Ensayo de comparación de equipos

Figura 2.A

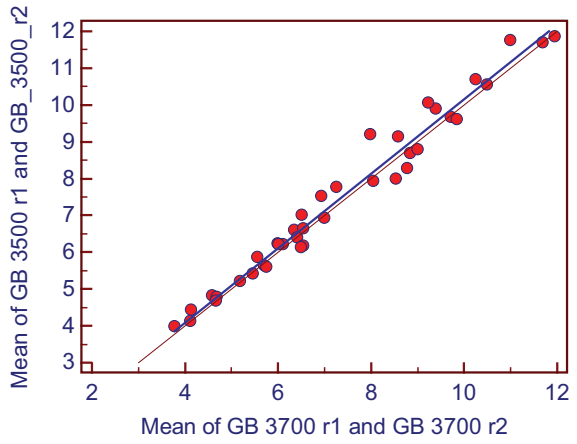


Figura 2.B

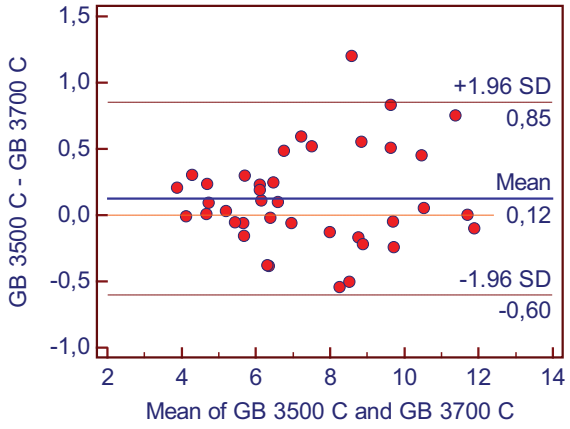


Figura 2.C

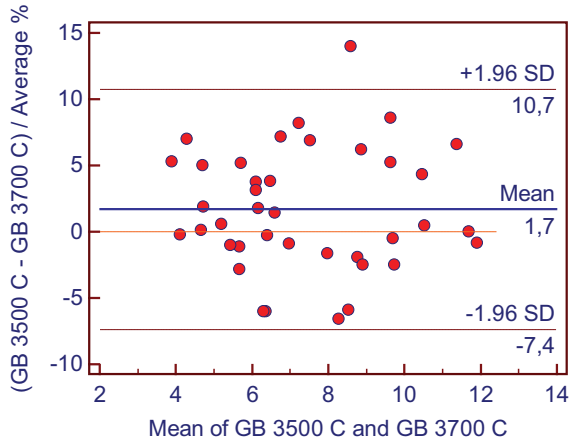


Figura 2.D

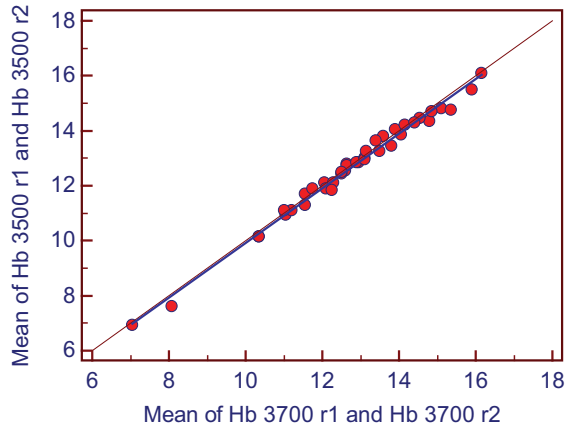


Figura 2.E

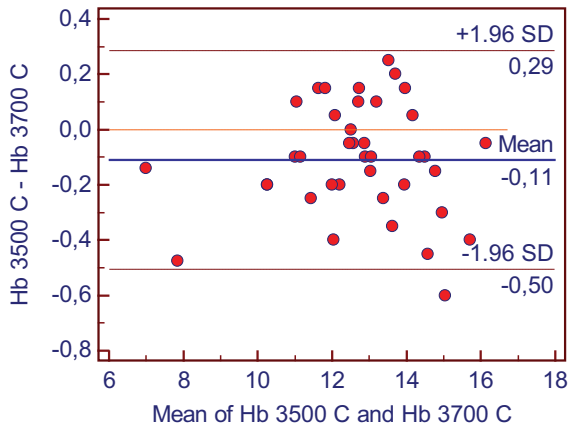


Figura 2.F

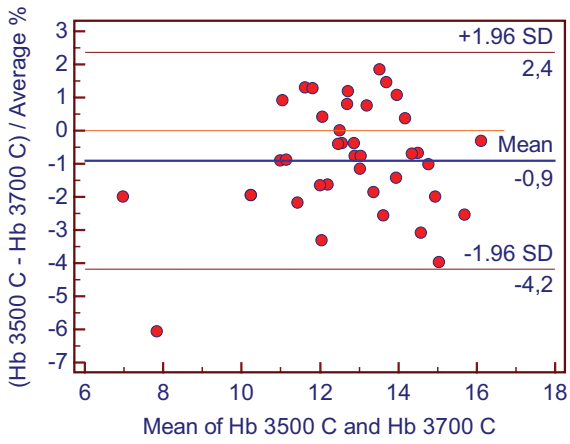


Figura 2.A. Gráfico de regresión de Deming para comparación de métodos (unidades de expresión de 10^3 cel./µL) para el analito GB (3500: CellDyn 3500; 3700: CellDyn 3700). Figura 2.B. Gráfico de Bland – Altman de las diferencias expresadas en valores absolutos para GB entre CD3500 y CD3700. Figura 2.C. Gráfico de Bland – Altman de las diferencias expresadas en términos relativos para GB entre CD3500 y CD3700. Figura 2.D. Gráfico de regresión de Deming para comparación de métodos (unidades de expresión en gr/dl) para el analito Hb (CD3500 *vs* CD3700). Figura 2.E. Gráfico de Bland – Altman de las diferencias expresadas en valores absolutos para Hb entre CD3500 y CD3700. Figura 2.F. Gráfico de Bland – Altman de las diferencias expresadas en términos relativos para Hb entre CD3500 y CD3700.

Este criterio no se cumplió para los analitos HTO y VCM (NDM = 14% y NDM = 80fl, respectivamente); sin embargo, esta situación no modificó la interpretación clínica del resultado.

En este sentido, las comparaciones de métodos realizadas fueron satisfactorias, y se evaluó el coeficiente de correlación "r", la ecuación de la recta obtenida por regresión de Deming (con los intervalos de confianza, IC, de cada parámetro evaluado) tabla VI.

Establecimiento de valores de referencia - intervalos de referencia

Como se mencionó anteriormente, para establecer la población de estudio y los valores de referencia - intervalos de referencia para los diferentes analitos hematológicos, se siguió el protocolo estipulado en el documento C28-A3 del CLSI[10].

En una primera instancia se analizaron los datos por separado según sexo. La normalidad de los datos se evaluó a través del test estadístico *D'agostino-Pearson*[11]. En los casos donde los datos no ajustaron a una distribución normal, se les aplicó transformación logarítmica para que ajusten a esa distribución. Luego se evaluó la presencia de OL aplicando el test de Tukey y Reed/Dixon[12]; los OL detectados fueron eliminados una vez finalizado el análisis. Después se evaluó la normalidad de la distribución para cada analito, y para ambos sexos, debiéndose aplicar transformación logarítmica en algunos de los casos evaluados. En una siguiente etapa, se aplicó test-z (prueba paramétrica) para evaluar diferencias entre las poblaciones de datos pertenecientes al sexo masculino, y aquellas pertenecientes al sexo femenino. Para aquellos analitos donde, luego de la transformación de datos, no se logró que ambos sexos ajusten a una distribución normal, se les aplicó el test no paramétrico Mann-Whitney[11].

Para los analitos que particionaron por sexo se establecieron los valores de referencia - intervalos de referencia, y los respectivos intervalos de confianza de los límites superior e inferior, según las pautas descriptas[10]. En el caso de los analitos que no particionaron por sexo, se realizó nuevamente sobre estos datos el análisis previamente descripto sin particionar, y posteriormente se establecieron los valores de referencias - intervalos de referencia (Tabla VII).

Se establecieron los valores de referencia - intervalos de referencia para los siguientes analitos: Hb, Hto, VCM, HCM, CHCM, RDW, GB, GR y Plaq. Los resultados obtenidos de los valores de referencia - intervalos de referencia de los distintos analitos se presentan en las tablas VIII y IX.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El proceso de evaluación de métodos es un requisito mandatorio que todo laboratorio bioquímico debe cumplimentar a los fines de establecer y evidenciar el desempeño

Tabla VI: Estudio de Veracidad a distintos Niveles de Decisión Médica.

NDM	CD3700C	CD3500C (IC95%)	|BIAS%|	|BIAS%| permitido (CLIA´88)
GB: 0,5 (10^3cel./µL)	0,5 (10^3cel./µL)	0,54 (0,40 a 0,68) (10^3cel./µL)	8	11,25
GB: 3 (10^3cel./µL)	3 (10^3cel./µL)	3,07 (2,95 a 3,19) (10^3cel./µL)	2,33	11,25
GB: 12 (10^3cel./µL)	12 (10^3cel./µL)	12,19 (12,07 a 12,31) (10^3cel./µL)	1,58	11,25
GB: 30 (10^3cel./µL)	30 (10^3cel./µL)	30,42 (30,10 a 30,74) (10^3cel./µL)	1,4	11,25
GR: 3,8 (10^6cel./µL)	3,8 (10^6cel./µL)	3,76 (3,49 a 4,03) (10^6cel./µL)	1,05	4,5
GR: 4,3 (10^6cel./µL)	4,3 (10^6cel./µL)	4,27 (4,00 a 4,54) (10^6cel./µL)	0,7	4,5
GR: 5,0 (10^6cel./µL)	5,0 (10^6cel./µL)	4,98 (4,71 a 5,25) (10^6cel./µL)	0,4	4,5
GR: 5,7 (10^6cel./µL)	5,7 (10^6cel./µL)	5,69 (5,41 a 5,97) (10^6cel./µL)	0,18	4,5
Hb: 4,5 (g/dL)	4,5 (g/dL)	4,59 (4,46 a 4,72) (g/dL)	2	5,25
Hb: 10,5 (g/dL)	10,5 (g/dL)	10,67 (10,56 a 10,78) (g/dL)	1,62	5,25
Hb: 17 (g/dL)	17 (g/dL)	17,25 (17,14 a 17,37) (g/dL)	1,47	5,25
Hb: 23 (g/dL)	23 (g/dL)	23,33 (23,19 a 23,47) (g/dL)	1,43	5,25
Hto: 14 (%)	14 (%)	12,57 (12,23 a 12,90) (%)	10,21	4,5
Hto: 33 (%)	33 (%)	32,1 (31,81 a 32,39) (%)	2,72	4,5
Hto: 56 (%)	56 (%)	55,74 (55,43 a 56,05) (%)	0,46	4,5
Hto: 70 (%)	70 (%)	70,14 (69,77 a 70,5) (%)	0,2	4,5
VCM: 80 (fL)	80 (fL)	78,55 (78,42 a 78,69) (fL)	1,81	*1,2
VCM: 100 (fL)	100 (fL)	99,01 (98,88 a 99,15) (fL)	0,99	*1,2
Plaq.: 50 (10^3cel./µL)	50 (10^3cel./µL)	50,37 (50,18 a 50,56) (10^3cel./µL)	0,74	18,75
Plaq.: 100 (10^3cel./µL)	100 (10^3cel./µL)	95,27 (95,10 a 95,44) (10^3cel./µL)	4,73	18,75
Plaq.: 600 (10^3cel./µL)	600 (10^3cel./µL)	544,27 (544,04 a 544,50) (10^3cel./µL)	9,28	18,75
Plaq.: 1000 (10^3cel./µL)	1000 (10^3cel./µL)	903,47 (903,06 a 903,88) (10^3cel./µL)	9,65	18,75

* |BIAS%| maximo permitido por variabilidad biológica (nivel deseable). CLIA´88 no reporta un Error Total permitido para VCM

NDM: Nivel de Decisión Médica; GB: Recuento de Glóbulos Blancos; Hb: Hemoglobina; CD3700C: Equipo CellDyn 3700 modo cerrado; CD3500C: Equipo CellDyn 3500 modo cerrado.

del sistema de medición que se implementará en la rutina del laboratorio bioquímico. Esta estrategia de evaluación de métodos, como desarrollo inicial sobre el sistema de medición, primeramente es clave en cuanto a la confiabilidad analítico-clínica de los resultados, pero además, permite introducir el concepto de mejora continua en un punto crítico del proceso de medición en los laboratorios bioquímicos. Actualmente, a diferencia de años anteriores, están perfectamente establecidos los pasos que deben seguirse en cuanto a responsabilidades y diseños de los ensayos para realizar una correcta evaluación de métodos, tanto para los fabricantes de un sistema de medición como para los laboratorios bioquímicos que adquieren e implementan estos sistemas de medición; sin embargo, en numerosas ocasiones esto no se cumple, situación que obliga al laboratorio bioquímico a desarrollar protocolos exhaustivos de evaluación de métodos, para poder establecer concretamente los índices de desempeño de los sistemas de medición desarrollados por los fabricantes, y poder de esta forma contrastarlos con los requerimientos internacionales de calidad para así emitir un juicio con evidencia objetiva sobre el desempeño del sistema de medición evaluado.

Una vez finalizado exitosamente el proceso de evaluación de métodos, habiendo cuantificado los diferentes parámetros analíticos y establecido los índices de desempeño del sistema de medición, resulta imprescindible establecer los valores de referencia - intervalos de referencia de los analitos que se medirán. Estos parámetros de referencia establecidos en una determinada población (clínicamente sana) como la que evaluamos en este trabajo, constituyen parámetros de comparación analítico, que el laboratorio bioquímico puede utilizar a modo de muestras controles, con el propósito de establecer la trazabilidad analítica respecto de los Valores de Referencia - Intervalos de Referencia establecidos.

Finalmente, consideramos relevante el realizar experiencias vinculadas a la evaluación de métodos en un laboratorio de Hematología, área de la Bioquímica donde la ausencia de materiales de referencias certificados contribuye a la dispersión de los resultados. En este sentido, el establecimiento de valores de referencia - intervalos de referencia, contribuye fuertemente a establecer la trazabilidad analítica en los analitos cuantificados.

Tabla VII: Análisis de partición en función del sexo.

Analito	Transformación	n°	D'agostino-Pearson (p-Valor)	Media	Z-obser.	Z-crítico	Mediana	Mann-Whitney (p-Valor)
GB (10^3 cel./µL)					1,19	2,99		
Hombre	Log_{10}	120	0,1342	0,8296			-	-
Mujer	Log_{10}	119	0,0721	0,8148				
GR (10^6 cel./µL)					13,81	2,97		
Hombre	(ninguna)	117	0,0874	4,9344			-	-
Mujer	(ninguna)	119	0,6287	4,3875				
Hb (g/dL)								<0,0001
Hombre	(ninguna)	120	0,009	-	-	-	14,7	
Mujer	(ninguna)	118	0,9522				13	
Hto (%)								<0,0001
Hombre	(ninguna)	118	0,0174	-	-	-	44,35	
Mujer	(ninguna)	117	0,9819				39,3	
VCM (fL)					0,95	2,93		
Hombre	(ninguna)	115	0,4899	89,96			-	-
Mujer	(ninguna)	114	0,3484	89,5877				
HCM (pg)					2,14	2,94		
Hombre	(ninguna)	118	0,9593	30,1381			-	-
Mujer	(ninguna)	113	0,6881	29,7956				
CHCM (g/dL)					3,46	2,97		
Hombre	(ninguna)	118	0,7677	33,4517			-	-
Mujer	(ninguna)	117	0,4528	33,2				
RDW (%)					2,89	2,95		
Hombre	(ninguna)	120	0,6047	14,3417			-	-
Mujer	(ninguna)	112	0,4203	14,0277				
Plaq. (10^3 cel./µL)					2,38	2,99		
Hombre	Log10	120	0,712	2,3657			-	-
Mujer	Log10	119	0,4157	2,3937				

GB: Recuento de Glóbulos Blancos; GR: Recuento de Glóbulos Rojos; Hb: Hemoglobina; Hto: Hematocrito; VCM: Volumen Corpuscular Medio; HCM: Hemoglobina Corpuscular Media; CHCM: Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media; RDW: Índice de distribución eritrocitaria; Plaq.: Recuento de Plaquetas; n°: Número de muestras

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1- Lewis, S.M.; Bain, B.J.; Bates, L. Dacie y Lewis Hematología Práctica. Pp: 535-552. 10ª ed, 2008.
2- Norma NM ISO 15189 Laboratorios Clínicos. Requisitos particulares relativos a la calidad y la competencia.
3- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Validation, Verification and Quality Assurance of Automated Hematology Analyzers; Approved Standard-Second Edition. CLSI document H26-A2.
4- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). User Verification of Performance for Precision and Trueness; Approved Guideline-Second Edition. CLSI document EP15-A2.
5- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedure: A Statistical Approach. Approved Guideline. CLSI document EP6-A.
6- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Method Comparison and Bias Estimation Using Patient Sample. Approved Guideline-Second Edition. CLSI document EP9-A2.
7- Guía de trabajos prácticos del Practicanato Preparatorio – Asignatura Practicanato Profesional, Departamento de Bioquímica Clínica – Facultad de Ciencias Químicas

Tabla VIII: Valores de Referencia - Intervalos de Referencia de analitos que particionan según sexo.

Analito	n°	O.L.	VR-IR	I.C. Lim. Inf. (90% Conf.)	I.C. Lim. Sup. (90% Conf.)
GR (10^3 cel./µL)					
Hombre	117	4	4,33 - 5,69	4,29 - 4,47	5,48 - 5,69
Mujer	119	2	3,84 - 4,96	3,72 - 3,97	4,88 - 5,13
Hb (g/dL)					
Hombre	120	1	13,6 - 17,2	13,5 - 13,7	16,8 - 17,3
Mujer	118	2	11,7 - 14,5	11,4 - 12,0	14,1 - 14,7
Hto (%)					
Hombre	118	3	40,7 - 50,7	40,4 - 41,1	49,8 - 51,7
Mujer	117	3	35,2 - 42,9	34,8 - 36,2	42,5 - 43,9
CHCM (g/dL)					
Hombre	118	3	32,3 - 34,8	31,8 - 32,6	34,5 - 34,9
Mujer	117	3	32,4 - 34,2	32,2 - 32,5	34,0 - 34,4

GR: Recuento de Glóbulos Rojos; Hb: Hemoglobina; Hto: Hematocrito; CHCM: Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media; n°: Número de muestras; O.L.: Valores anómalos; VR-IR: Valores de Referencia-Intervalo de Referencia; I.C. Li. Inf.: Intervalo de confianza del Límite Inferior del Intervalo de Referencia; I.C. Lim. Sup.: Intervalo de confianza del Límite Superior del Intervalo de Referencia.

Tabla IX: Valores de Referencia - Intervalos de Referencia de analitos que no particionan según sexo

Analito	n°	O.L.	VR-IR	I.C. Lim. Inf. (90% Conf.)	I.C. Lim. Sup. (90% Conf.)
GB (10^3 cel./µL)	239	2	4,12 - 10,20	3,92 - 4,68	9,86 - 10,70
VCM (fL)	232	9	82,2 - 95,0	81,4 - 83,6	94,5 - 96,1
HCM (pg)	232	9	27,5 - 32,6	27,1 - 28,0	32,2 - 33,2
RDW (%)	234	7	12,6 - 16,1	12,2 - 12,8	15,8 - 16,2
Plaq. (10^3 cel./µL)	241	0	154,15 - 369,6	148 - 167	343 - 408

GB: Recuento de Glóbulos Blancos; VCM: Volumen Corpuscular Medio; HCM: Hemoglobina Corpuscular Media; RDW: Índie de Distribución Eritrocitario; Plaq.: Recuento de Plaquetas; n°: Número de muestras; O.L.: Valores anómalos; VR-IR: Valores de Referencia-Intervalo de Referencia; I.C. Li. Inf.: Intervalo de confianza del Límite Inferior del Intervalo de Referencia; I.C. Lim. Sup.: Intervalo de confianza del Límite Superior del Intervalo de Referencia.

– Universidad Nacional de Córdoba – Año 2012.
8- Riley, C.M.; Rosanske, T.W. Development and Validation of Analytical Methods. Pp: 15-71; 249-292. 1er ed, 1996.
9- Westgard, J.O. Basic QC Practices. Pp: 1-58; 129-211. 3rd ed, 2010.
10- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory; Approved Guideline-Third Edition. CLSI document C28-A3.
11- MedCalc. Statistical software. MedCalc Software bvba. Acacialaan 22, B-8400 Ostend, Belgium. (www.medcalc.org).
12- Tukey JW. *Exploratory Data Analysis*. Reading, MA: Addison-Wesley; 1977:688.
13- Koch D, Oryall J, Quam E, Feldbruegge D, Dowd D, Barry P, *et al*. Selection of medically useful quality-control procedures for individual tests done in a multitest analytical system. Clin Chem 1990; 2(36): 230-3.
14- INFOSTAT. Software estadístico, Grupo de estadística aplicada, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba. (www.infostat.com.ar)
15- ISO / IEC 17043: vigente: Evaluación de la conformidad – Requisitos generales para los ensayos de aptitud.
16- CE-LE-01 "Políticas y criterios para la participación en ensayos de aptitud / comparaciones interlaboratorios" del Organismo Argentino de Acreditación (OAA) (v09, 21/02/2013).